

p-ISSN: 2406-7489 e-ISSN: 2406-9337

Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis,

Januari 2019, 6(1):85-91

Terakreditasi

Ditjen Penguatan Riset dan Pengembangan, Kemenristekdikti

Keputusan No: 21/E/KPT/2018, Tanggal 9 Juli 2018

<http://ojs.uho.ac.id/index.php/peternakan-tropis>**Kapasitasi Spermatozoa Sapi Peranakan Ongole dalam Berbagai Formulasi Pengencer Air Kelapa Selama Simpan Dingin****Dedi Muhammad^{1*}, Nurul Isnaini¹, Kuswati¹, Aulia Puspita Anugra Yekti¹, Muchmad Luthfi², Lukman Affandhy Sunarto², Trinil Susilawati^{1*}**¹Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang
Jl. Veteran, Lowokwaru, Malang, Jawa Timur 65145²Loka Penelitian Sapi Potong Grati
Jl. Pahlawan 2, Grati, Pasuruan, Jawa Timur 67184*Email korespondensi: dedi.pendidik@gmail.com; trinil_susilawati@yahoo.com

(Diterima: 19-12-2018; disetujui 10-1-2019)

ABSTRAK

Pengencer dasar air kelapa merupakan solusi dari sulit dan mahal nya harga pengadaan bahan baku pembuatan pengencer. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kapasitas spermatozoa sapi Peranakan Ongole dalam berbagai formulasi pengencer air kelapa selama simpan dingin pada suhu 4-5°C. Metodologi yang digunakan adalah eksperimental laboratorium menggunakan rancangan acak kelompok (RAK). Terdapat tiga perlakuan yaitu, P1 = Pengencer air kelapa + 20% kuning telur, P2 = Pengencer air kelapa + 20% kuning telur + 0,4% putih telur + fruktosa 1000 mg/l. P3 = Pengencer air kelapa + 20% kuning telur + 0,4% putih telur + fruktosa 2000 mg/l, dengan 10 ulangan. Hasil menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada persentase spermatozoa belum kapasitas, terkapasitas dan telah reaksi akrosom antara perlakuan formulasi pengencer air kelapa yang berbeda (P1, P2, P3) selama peyimpana suhu 2-5°C. Pengencer berbasis air kelapa mampu mempertahankan kualitas akrosom diatas 50% penyimpanan hari ke lima.

Kata kunci : air kelapa, kapasitas, reaksi akrosom, semen cair

ABSTRACT

Coconut water extender is the solution to the difficulty and high costs of semen diluents. The objective of this study were to examine the capacitation of Ongole Crossbreed sperm in various formulations of coconut water extender during storage in 4-5 °C. The study method used laboratory experimental. The experimental design was Randomized Completely Block Design and the data were analyzed by Analyze of Variance. There are three treatments in this study (P1 = Coconut Water + 20% of yolk, P2 = Coconut Water + 20% of yolk + 0,4% white egg + fructose 1 mg/ml, dan P3 = Coconut Water + 20% of yolk + 0,4% white egg + fructose 2 mg/ml) and ten replications of each treatment. There were not significant differences in percentage of sperm uncapacitation, sperm capacitation and sperm acrosom reaction between various formulations of coconut water diluents during chilled storage at 4-5 °C. Coconut water diluents are able to maintain quality of sperm acrosom up to day 5th with values above 50%.

Keywords: acrosom reaction, capacitation, coconut water, liquid semen

PENDAHULUAN

Metode penyimpanan semen dalam bentuk semen cair telah terbukti mampu mengurangi tingkat kerusakan membran spermatozoa. Semen cair dibuat dengan menambahkan pengencer kemudian disimpan pada suhu 2-4 °C (Susilawati

et al., 2018). Bahan pengencer yang ditambah bertujuan untuk memenuhi nutrisi dan menyediakan lingkungan yang sesuai bagi spermatozoa. Disamping itu pengencer juga harus memiliki kemampuan untuk melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat suhu, dibuat

dari bahan-bahan lokal yang mudah didapatkan, dan harganya tidak mahal (Susilawati, 2011).

Air kelapa sebagai bahan lokal yang mudah didapatkan di lingkungan sekitar dapat dijadikan sebagai pengencer semen alternatif. Kandungan beberapa karbohidrat, mineral, serta zat-zat lain dalam air kelapa mampu memenuhi kebutuhan spermatozoa. Vigliar, Sdepanian, and Neto (2006) menyatakan bahwa air kelapa mengandung unsur karbon berupa karbohidrat sederhana, seperti: sukrosa, glukosa, dan fruktosa. Yong *et al.* (2009) menambahkan bahwa kandungan yang terkandung di dalam air kelapa muda yaitu air 94,180 g/100g, lipid 0,073 g/100g, protein 0,120 g/100g, pH 4,7 dan mengandung beberapa ion yaitu Na, Zn, Fe, P, Ca, Mn, Cu serta beberapa asam amino yaitu arginin, metionin, alanin, lisin, aspartat fenilalanin, glisin, serin, glutamat, prolin, histidin, isoleusin, treonin, valin dan leusin.

Penambahan bahan pengencer selama proses pengenceran semen dapat menyebabkan turunnya kadar zat-zat yang terkandung dalam plasma semen, misalnya kadar asam amino, lemak dan ion-ion yang dapat mempengaruhi keseimbangan osmolaritas yang dapat mempengaruhi motilitas dan kapasitas spermatozoa (Adnani, Bebas, dan Budiasa, 2012). Sumber energi berupa fruktosa serta zat makromolekul berupa protein ditambahkan dalam pengencer air kelapa diharapkan mampu menggantikan beberapa zat yang telah hilang dari plasma semen akibat proses pengenceran sehingga mampu mempertahankan kehidupan spermatozoa.

Hasil Audia *et al.* (2017); Mugiyati *et al.* (2017); Salim *et al.* (2018) menunjukkan bahwa penggunaan pengencer air kelapa dengan varietas yang berbeda sebagai pengencer semen kambing boer mampu mempertahankan kualitas spermatozoa yang masih baik hingga hari ke 2 pada penyimpanan suhu 4-5°C. Daramola *et al.* (2016) menambahkan bahwa pengencer air kelapa memiliki kemampuan menjaga integritas akrosom spermatozoa rusa dengan baik. Hal tersebut memungkinkan spermatozoa terjaga dari kapasitas dan reaksi akrosom.

Pengencer dengan bahan dasar air kelapa dengan penambahan kuning telur sebagai bahan krioprotektan, fruktosa sebagai substrat energi tambahan dan putih telur sebagai makromolekul diharapkan dapat mempertahankan kualitas dan status belum kapasitas spermatozoa seoptimal mungkin. Berdasarkan uraian tersebut perlu dilakukan penelitian tentang kapasitas

spermatozoa sapi PO (Peranakan Ongole) dalam berbagai formulasi pengencer air kelapa selama simpan dingin.

METODE PENELITIAN

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Loka Penelitian Sapi Potong Grati Pasuruan dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan April 2018.

Semen Sapi PO

Semen sapi PO yang digunakan memiliki kriteria motilitas massa minimal 2+, motilitas individu minimal 70%. Frekuensi penampungan paling banyak dua kali per minggu. Semen ditampung menggunakan teknik vagina buatan.

Pengencer Air Kelapa

Pengencer air kelapa dibuat dari bahan dasar air kelapa yang diambil dari jenis kelapa hijau (*Cocos nucifera*) dengan usia buah 5 sampai 8 bulan. Sebelum air kelapa digunakan, terlebih dahulu disaring menggunakan kertas saring halus kemudian dipanaskan dengan suhu 57 °C selama 25 menit. Pemanasan bertujuan untuk menonaktifkan enzim yang ada pada air kelapa. Setelah itu ditambahkan NaHCO₃ 1 mg/ml sebagai buffer, antibiotik streptomycin sulfate 1 mg/ml dan penicillin 1 mg/ml, 20% kuning telur ayam ras, dan sebagai perlakuan yaitu putih telur ayam 0,4%, fruktosa 10 dan 20 mg/ml.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 3 perlakuan dan setiap perlakuan diulang 10 ulangan. Pengelompokan dilakukan berdasarkan waktu penampungan. Perlakuan terdiri atas: Perlakuan pertama (P1) = Pengencer air kelapa + 20% kuning telur ayam ras. Perlakuan kedua (P2) = Pengencer air kelapa + 20% kuning telur ayam ras + 0,4% putih telur + fruktosa 1000 mg/l. Dan perlakuan ketiga (P3) = Pengencer air kelapa + 20% kuning telur + 0,4% putih telur + fruktosa 2000 mg/l.

Pemeriksaan Status Akrosom (CTC)

Metode pemeriksaan status akrosom menggunakan mikroskop *epifluorescence* dengan pewarnaan *Chlortetracycline* (CTC). Prosedur pewarnaan CTC yang digunakan dalam pemeriksaan status akrosom dilakukan dengan cara yaitu 45 µl semen yang diperiksa dimasukkan ke dalam ependrof kapasitas 1,5 ml, tambahkan 45 µl larutan pewarna CTC kemudian goyang - goyang selama 2-3 menit, setelah itu

ditambahkan 8 µl CTC Fixative dan digoyang lagi selama 1 menit. Dari larutan tersebut diambil 10 µl kemudian ditempatkan pada *object glass* kemudian ditambahkan 10 µl larutan 1,4-*diazabicyclooctane* (DABCO) kemudian dicampur rata secara hati-hati, setelah itu ditutup dengan cover glass. Tahap terakhir ditutup dengan tisu yang tebal kemudian ditekan-tekan secara hati-hati, tepi cover glass ditutup menggunakan cutex untuk melindungi preparat dari kerusakan (Morado *et al.*, 2015).

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisa menggunakan analisis ragam (ANOVA) dengan RAK (Rancangan Acak Kelompok) kemudian dilakukan pengujian lanjut menggunakan *Duncan's Multiple Range Test* (Uji Jarak Berganda Duncan).

Tabel 1. Rata-rata kualitas semen sapi PO sebelum pengenceran

Parameter	Rata-rata ± simpang baku
Makroskopis	
Volume per ejakulat (ml)	4,67 ± 0,58
Warna	Putih susu
pH	6,47 ± 0,12
Konsistensi	kental
Mikroskopis	
Motilitas Massa	++
Motilitas Individu (%)	71,67 ± 2,89
Viabilitas (%)	91,39 ± 2,38
Abnormalitas (%)	2,81 ± 0,80
Konsentrasi (juta/ml)	1260,00 ± 222,71
Spermatozoa Belum Kapasitasi (%)	86,40 ± 1,97
Spermatozoa Terkapasitasi (%)	9,41 ± 1,35
Spermatozoa Telah Reaksi Akrosom (%)	4,19 ± 1,02

Hasil tersebut termasuk rendah jika dibandingkan dengan pernyataan Garner *and* Hafez (2008) bahwa volume semen sapi hasil penampungan berkisar antara 5-8 ml. Adapun pH semen rata-rata 6,47±0,12. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa pH semen yang digunakan untuk penelitian adalah normal. Ax *et al.*, (2008) menjelaskan bahwa pH semen sapi berkisar antara 6,4 sampai 7,8.

Rata-rata persentase motilitas massa semen sapi PO yang digunakan untuk penelitian adalah 2+. Persyaratan motilitas massa agar semen dapat diproses minimal 2+ (Ducha *et al.*, 2013). Rataan motilitas individu semen segar sapi PO yang digunakan adalah 71,67±2,89 %. Muhammad *et al.* (2016) menyatakan bahwa syarat minimal nilai motilitas semen untuk diencerkan adalah 70%. Nilai konsentrasi spermatozoa semen sapi PO yang digunakan adalah 1260,00±222,71 juta/ml. Garner *and* Hafez (2008) bahwa

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Sapi PO

Pemeriksaan semen sapi PO sebelum diencerkan meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi pemeriksaan pH, warna, volume, dan konsistensi spermatozoa. Pemeriksaan mikroskopis terdiri dari pemeriksaan motilitas massa, motilitas individu, abnormalitas, viabilitas, konsentrasi, status akrosom spermatozoa. Rata-rata dan simpangan baku kualitas semen sapi PO sebelum dilakukan pengenceran dapat dilihat pada Tabel 1.

Rata-rata hasil pengamatan volume semen dari sapi PO yang digunakan untuk penelitian adalah 4,67 ± 0,58 ml.

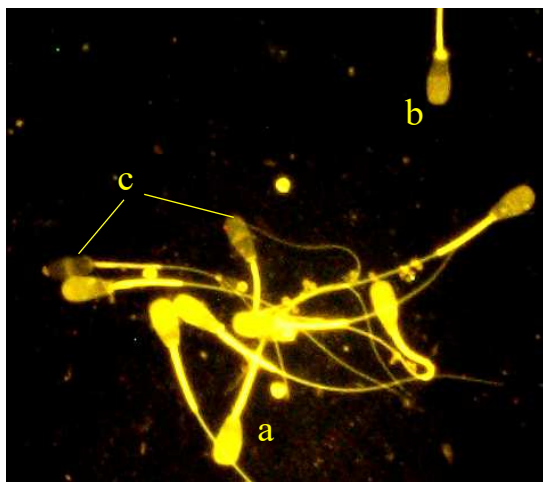
konsentrasi semen sapi bervariasi dari 1.000-1.800 juta spermatozoa setiap mililiter atau 800-2.000 juta spermatozoa setiap mililiter. Rata-rata viabilitas spermatozoa sapi PO yang digunakan untuk penelitian adalah 91,39±2,38 %. Hal tersebut memiliki arti bahwa semen sapi PO yang digunakan dalam penelitian termasuk memenuhi syarat untuk digunakan. Ducha *et al.* (2013); Ismaya (2014) yang menyatakan bahwa semen yang akan diencerkan paling tidak minimal jumlah spermatozoa yang hidup 70%.

Rata-rata persentase spermatozoa pada semen sapi PO yang belum mengalami kapasitasi secara berurutan yaitu 86,4±2,0%. Rata-rata persentase spermatozoa yang sudah mengalami kapasitasi yaitu 9,4±1,3%. Dan rata-rata persentase spermatozoa yang telah mengalami reaksi akrosom yaitu 4,2±1,0%. Ervandi, Susilawati, Wahyuningsih (2013) menyatakan bahwa semen sapi memiliki rata-rata

spermatozoa yang belum mengalami kapasitasi sebesar 87,5%, spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi 9,4% dan telah mengalami reaksi akrosom 3,0%. Yeste, Briz, Pinart, Sancho, Garcia-Gil, Badia, Bassols, Pruneda, Bussalleu, Casas, Bonet (2008) menyatakan bahwa angka status akrosom semen sapi yaitu spermatozoa belum kapasitasi sekitar 85%, spermatozoa terkapasitasi sekitar 10%, dan spermatozoa telah mengalami reaksi akrosom sekitar 7%.

Spermatozoa Belum Kapasitasi

Pemeriksaan status akrosom pada spermatozoa terdiri dari persentase spermatozoa belum kapasitasi, persentase spermatozoa terkapasitasi, dan persentase spermatozoa yang telah reaksi akrosom. Kondisi status akrosom spermatozoa sapi teridentifikasi salah satunya melalui perubahan peredaran kalsium pada sel spermatozoa yang bisa diamati menggunakan mikroskop epi-fluoresens dengan pewarnaan CTC. Hasil pengamatan spermatozoa menggunakan mikroskop epi-fluoresens ditunjukkan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Status Akrosom Spermatozoa Diamati Dengan Mikroskop *Epi-fluorescence*. a = belum kapasitasi, b: spermatozoa terkapasitasi, c: spermatozoa telah reaksi akrosom.

Adapun rata-rata dan simpang baku spermatozoa yang belum mengalami kapasitasi pada semen sapi PO baik sebelum pengenceran Tabel 2. Rata-rata spermatozoa belum kapasitasi

maupun setelah pengenceran ditunjukkan pada Tabel 2.

Hasil analisis ragam dari persentase spermatozoa yang belum mengalami kapasitasi selama penyimpanan pada suhu dingin antar formulasi pengencer air kelapa yang berbeda (P1, P2, dan P3) menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) pada penyimpanan hari ke-1 dan hari ke-5. Meskipun demikian, persentase spermatozoa yang belum mengalami kapasitasi tergolong tinggi dari semua perlakuan hingga penyimpanan hari ke-5 yaitu di atas 60%. Spermatozoa dalam mempertahankan kondisi sehingga tidak mengalami kapasitasi sangat dipengaruhi oleh kolesterol membran. Moore *et al.* (2005) melaporkan bahwa kejadian penurunan yang signifikan pada kolesterol membran spermatozoa setelah dilakukan penurunan suhu yang sangat drastis. Kolesterol pada membran memiliki fungsi sebagai agen kapasitasi, jumlah dan distribusi kolesterol pada membran mengindikasikan tahapan-tahapan kapasitasi. Gualtieri (2010) menambahkan bahwa penipisan kolesterol membran spermatozoa menyebabkan peningkatan permeabilitas membran terhadap kalsium dan bikarbonat intraseluler yang pada akhirnya mengurangi persentase spermatozoa yang belum mengalami kapasitasi.

Spermatozoa Terkapasitasi

Kapasitasi adalah proses pelepasan bahan-bahan pelapis membran spermatozoa secara bertahap, terutama pada bagian akrosom (Susilawati, 2011). Persentase spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi merupakan salah satu parameter yang perlu diperhatikan untuk menentukan kualitas spermatozoa (Gualtieri, 2010). Rata-rata persentase spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi pada kondisi segar, setelah penyimpanan hari ke-1 dan ke-5 ditunjukkan pada Tabel 3.

Hasil analisis ragam terhadap persentase spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi selama penyimpanan pada suhu dingin antar formulasi pengencer air kelapa yang berbeda (P1, P2, dan P3) juga menunjukkan

P	Rata-rata spermatozoa belum kapasitasi (%) \pm Simpang baku		
	Segar	H1	H5
P1	86,02 \pm 2,63	83,7 \pm 0,56	64,85 \pm 0,70
P2	86,02 \pm 2,63	83,9 \pm 1,23	66,03 \pm 0,91
P3	86,02 \pm 2,63	83,6 \pm 1,45	65,87 \pm 0,22

Keterangan : P = Perlakuan, H = Hari penyimpanan.

tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) pada penyimpanan hari ke-1 dan hari ke-5. Meskipun tidak menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan namun berdasarkan hasil pada tabel diketahui bahwa jumlah spermatozoa yang mengalami kapasitasasi semakin hari semakin meningkat. Moore *et al.* (2005); Guyton dan Hall (2007) menjelaskan terjadinya penurunan yang signifikan pada kolesterol membran spermatozoa setelah pengenceran dan pendinginan. Kolesterol pada membran dapat berfungsi sebagai agen kapasitasasi. Jumlah serta distribusi kolesterol membran spermatozoa mengindikasikan tahapan-tahapan kapasitasasi. Penipisan kolesterol pada membran merupakan salah satu tahapan pertama dari kejadian kapasitasasi yang ditandai oleh penurunan stabilitas membrane. Penipisan kolesterol membran dapat menyebabkan peningkatan kalsium intraseluler dan bikarbonat untuk mengaktifkan AC, menghasilkan cAMP, dan mengaktifkan PKA, selanjutnya *protein kinase* membuka kanal ion pada membran dan memodulasi peningkatan kalsium intraseluler.

Spermatozoa Telah Reaksi Akrosom

Rata-rata spermatozoa yang telah mengalami reaksi akrosom pada kondisi segar, setelah penyimpanan hari ke-1 dan ke-5 ditunjukkan pada Tabel 4.

Hasil analisis ragam persentase spermatozoa yang telah mengalami reaksi akrosom antar perlakuan formulasi pengencer air kelapa yang berbeda (P1, P2, P3) yang berbeda pada bangsa sapi PO selama simpan dingin pada suhu 4-5°C menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) pada penyimpanan hari ke-1 dan hari ke-5. Persentase keutuhan akrosom tersebut mengindikasikan bahwa tidak terdapat kerusakan spermatozoa yang dapat menurunkan kualitas kemampuan fertilisasi dari spermatozoa selama penyimpanan menggunakan pengencer air kelapa. Hernandez *et al.* (2012) menyatakan bahwa spermatozoa dikatakan kehilangan kemampuan fertilisasinya apabila kerusakan akrosom melebihi 50%. Kerusakan akrosom spermatozoa tersebut berkaitan dengan fungsi membran sebagai pelindung akrosom spermatozoa. Guyton dan Hall (2007) menambahkan bahwa kolesterol merupakan salah satu komponen penyusun membran spermatozoa dan juga berfungsi memberikan sifat fluiditas pada membran sehingga tidak mudah rusak. Kandungan kolesterol tinggi pada membran akan membuat membran semakin bersifat lentur sebaliknya semakin rendah kandungan kolesterol pada membran akan menyebabkan spermatozoa semakin mudah mengalami kerusakan.

Tabel 3. Rata – rata spermatozoa terkapasitasi

P	Rata-rata spermatozoa belum kapasitasasi (%) ± Simpang baku		
	Segar	H1	H5
P1	9,99 ± 2,63	10,71 ± 0,56	23,27 ± 0,70
P2	9,99 ± 2,63	10,90 ± 0,60	21,87 ± 0,35
P3	9,99 ± 2,63	10,79 ± 0,31	22,11 ± 1,06

Keterangan : P = Perlakuan, H = Hari penyimpanan.

Tabel 4. Rata-rata spermatozoa telah reaksi akrosom

P	Rata-rata spermatozoa telah reaksi akrosom (%) ± Simpang baku		
	Segar	H1	H5
P1	3,99 ± 1,36	5,56 ± 0,20	11,80 ± 0,40
P2	3,99 ± 1,36	5,21 ± 0,64	12,11 ± 0,56
P3	3,99 ± 1,36	5,61 ± 1,14	12,02 ± 0,84

Keterangan : P = Perlakuan, H = Hari penyimpanan.

KESIMPULAN

Tidak terdapat perbedaan pada persentase spermatozoa belum kapasitasasi, terkapasitasi, dan telah reaksi akrosom antara perlakuan formulasi pengencer air kelapa yang berbeda (P1, P2, P3) selama penyimpanan suhu 2-5°C. Pengencer berbasis air kelapa mampu mempertahankan kualitas akrosom diatas 50% penyimpanan hari ke lima.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kemenristek DIKTI yang telah memberikan dana penelitian dengan skema PUPTN dan Lembaga Pengelolah Dana Pendidikan (LPDP) melalui program BPI. Terima kasih juga kepada Loka Penelitian Sapi Potong Grati yang menyediakan tempat penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnani Luh P.D.H, W. Bebas, & M.K. Budiasa. 2012. Penambahan bovine serum albumin pada pengencer kuning telur terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa anjing. *Indonesia Medicus Veterinus* 1(4):519-529.
- Audia R.P., M.A. Salim, N. Isnaini & T. Susilawati. 2017. Pengaruh perbedaan kematangan air kelapa hijau sebagai bahan pengencer yang ditambah 10% kuning telur terhadap kualitas semen cair kambing Boer. *Jurnal Ternak Tropika* 18(1):58-68.
- Ax R., M. Dally, B. Didion, R. Lenz, C. Love, D. Varner, Hafez, & M. Bellin. 2008. Semen Evaluation. In *Reproduction in Farm Animal* (7th edition). Edited by Hafez, E.S.E. Co. Director. Reproductive Health Kiawah Island. South Carolina. USA. pp 365-370.
- Daramola J.O, E.O. Adekunle, O.E. Oke, O.M. Onagbesan, I.K. Oyewusi, & J.A. Oyewusi. Effects of coconut (*Cocos nucifera*) water with or without egg-yolk on viability of cryopreserved buck spermatozoa. *Anim. Reprod.*, Belo Horizonte 13(2):57-62.
- Ducha N., T. Susilawati, Aulanni'am, & S. Wahjuningsih. 2013. Motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi Limousin selama penyimpanan pada refrigerator dalam pengencer CEP-2 dengan suplementasi kuning telur. *Jurnal Kedokteran Hewan* 7(1):5-8.
- Ervandi M., T. Susilawati, & S. Wahyuningsih. 2013. Effect of Different Diluents on the Quality of Sperm Sexing Cows With a Gradient Albumin (Egg White). *Indonesian Journal of Animal and Veterinary* 18 (3):177-184.
- Garner D.L. & E.S.E. Hafez. 2008. Spermatozoa and Seminal Plasma. In *Reproduction in Farm Animals* (7th edition). Edited by E.S.E Hafez and B. Hafez. 2008. Lippincott & Williams. Baltimore, Maryland. USA. pp 96-109.
- Gualtieri R. 2010. Ability of Sulfated Glycoconjugates and Disulfide Reductants to Release Bovine Epididymal Sperm Bound to the Oviductal Epithelium In Vitro. *Theriogenology* 73:1037-1043.
- Guyton A.C. & J.E. Hall. 2007. *Fisiologi Kedokteran*. Edisi 11. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Hernandez P.J.E. R.F. Fernandez, S.J.L. Rodriguez, M.Y.G. Soto, J.E.H. Verona, & R.A.D. Garcia. 2012. Post-thaw acrosomal viability and reaction in sperm obtained from equine epididymis tail. *Rev Salud Anim.* 34(2):84-88.
- Ismaya. 2014. *Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Moore A.I., E.L. Squires, & J.K. Graham. 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improve cryosurvival. *Cryobiology* 51(3):241-249.
- Morado S., V. Pereyra, E. Breininger, R. Sara, & P. Cetica. (2015). Study of sperm evaluation parameters to estimate cryopreserved bovine semen fertility. *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry* 2(1):1005.
- Muhammad D., T. Susilawati, & S. Wahjuningsih. 2016. Pengaruh penggunaan CEP-2 dengan suplementasi kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi FH (Frisian Holstein) kualitas rendah selama penyimpanan suhu 4-5°C. *Jurnal Ternak Tropika* 17(1):66-76.
- Mugiyati, M. A. Salin, N. Isnaini, & T. Susilawati. 2017. Pengaruh air kelapa merah yang muda dan tua sebagai pengencer terhadap kualitas semen kambing Boer selama penyimpanan dingin. *Jurnal Ternak Tropika* 18(1):20-26.
- Salim M.A., M.N. Ihsan, N. Isnaini, A.P.A. Yekti, & T. Susilawati. 2018. Quality of Boer goat liquid semen on different coconut water diluent (*Cocos nucifera*) during cold storage. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences* 20:150-157.
- Susilawati, T. 2011. *Spermatology*. Universitas Brawijaya (UB) Press. Malang.
- Susilawati T., D. Ratnawati, N. Isnaini, Kuswati & A. P. A. Yekti. 2018. Character of liquid semen motility in various diluents on Balinese cattle during cold storage. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences* 20(1):166-172.

- Vigliar R., V. L. Sdepanian, & U. Fagundes-Neto. 2006. Biochemical profile of coconut water from coconut palms planted in an Inland Region. *Jornal de Pediatria*. 82(4):308-312.
- Yeste, M., M. Briz, E. Pinart, S. Sancho, N. Garcia-Gil, E. Badia, J. Bassols, Pruneda, E. Bussalleu, I. Casas, & S. Bonet. 2008. Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 days of storage at 15 °C. *animal reproduction science* 109:236-250.
- Yong J.W.H., L. Ge, Y.F. Ng & S.N. Tan. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*. 14: 5144-5164.